云 南 植 物 研 究 1988; 10 (4): 381—388
Acta Botanica Yunnanica

马槟榔甜味蛋白N-和C-末端部分氨基酸顺序的测定

刘小烛　　胡　忠

(中国科学院昆明植物研究所，昆明)

摘要　从马槟榔（*Capparis masaikai*）种子中曾分离出二种甜味蛋白，称为Mabinlin Ⅰ和Ⅱ，分子量分别为11.6kD和10.4kD。用Edman降解和反相HPLC鉴定 PTH-aa 方法测定证明：二者的N末端均因焦谷氨酸环化而封闭。采用1 mol/l HCl-甲醇溶液35℃处理24小时的方法可使之开环。二种蛋白N端肽8个氨基酸残基顺序均为：Pyroglutamic acid-Pro-Arg-Gly-Pro-Ala-Leu-Arg-。用羧肽酶酶解的动态分析证明 MaI 羧端的氨基酸顺序为 -Phe-Gln-Leu-Ala-Ser，Ma Ⅱ为-Phe-Gln-Leu-Ala。其差别仅在于Ma Ⅱ缺一个Ser，这一结果表明Ma Ⅰ和Ma Ⅱ的主要差异不是在端肽。

关键词　甜味蛋白；马槟榔；氨基酸顺序测定

前文曾报告从马槟榔种子中分离出二种甜味蛋白，分别被称为马槟榔甜蛋白Ⅰ和Ⅱ（mabinlin Ⅰ、Ⅱ，缩写为Ma Ⅰ和Ma Ⅱ）[1]。它们的分子量分别为11.6和10.4 kD，氨基酸组成中有大部分残基是相同的[2]，但是 Ma Ⅱ对热处理远比 Ma Ⅰ稳定[3，4]。为了了解蛋白质结构和甜味之间的关系及这二种甜蛋白结构上的异同，必须确定它们的一级结构。本文简要报告Ma Ⅰ和Ma Ⅱ的N-和C-末端部分氨基酸顺序的分析。

材 料 和 方 法

1.甜蛋白巯基的羧甲基化

甜蛋白样品的制备方法参见以前所述[2]。还原变性和羧甲基化的方法参见Needleman[5]。所用巯基乙醇来自fluka，碘乙酸为 BDH 产品。反应后的溶液通过 Sephadex G25脱盐，蒸馏水洗脱，将蛋白质部分上CM-纤维素柱，用0—1 mol/l NaCl作线性梯度洗脱，分离出羧甲基化蛋白，经脱盐浓缩、冻干，于低温存放。

2.氨基酸组成分析

羧甲基化蛋白加5.7 mol/l盐酸，充氮封管，于110°C水解24 h。其水解液氨基酸组成在LKB 4400氨基酸自动分析仪上测定，用羧肽酶水解释放的氨基酸也在LKB 4400上分析。其中确定Gln与Asn的测定用生理体液的分析方法。

1987-10-31收稿

3.环化焦谷氨酸的开环方法

取甜蛋白1 mg，加盐酸-甲醇溶液（1 mol/l HCl/MeOH = 1/11 V/V），充氮封口，混合后于35°C保温24 h，氮气吹干。

4. Edman 降解法[5]

将开过环的蛋白样品分别加入0.5 ml、0.4 mol/l浓度的甲基吗啉（日本TCI产品）缓冲液（pH 8.4），40 µl PITC（日本TCI产品），充氮、密塞，50°C 保温35 分钟。然后用苯萃取除去剩余的PITC，氮气吹干。加入0.5 ml TFA（日本TCI产品），充氮，50°C保温10分钟，氮气吹干。再加入重蒸水0.5 ml，用乙酸乙酯萃取 PTC-aa，水层作下一次降解。有机层用氮气吹干乙酸乙酯后得 PTC-aa。然后加入 0.5 ml、1 mol/l HCl，充氮，密塞，80°C保温10分钟，氮气吹干得到PTH-aa。

5. PTH-aa的HPLC鉴定法

使用岛津LC-3A高效液相色谱仪分析，层析柱Zorbax-ODS(4.6 mm I. D × 25cm)，检测波长267 nm，流速0.8 ml/min，柱温40°C。用二套溶液洗脱样品。第一套为二步梯度洗脱，先用0.01 mol/l NaAc 缓冲液pH 4.5/甲醇（1：1，V/V）溶液洗脱5分钟再自动转换为0.01 mol/l NaAc缓冲液pH 6.0/甲醇（1：1，V/V）溶液洗脱15分钟。该系统能分离除Arg以外的PTH-aa，但Pro、Val和Trp之间不能分辨（图5），这4种PTH-aa须第二套缓冲液洗脱，成分为0.01 mol/l NaAc缓冲液pH 6.0/甲醇（1：4，V/V），结果见图5。若对待测的PTH-aa产生疑问时，加入标准PTH-aa（日本TCI产品）加以验证。

6.羧肽酶酶解反应

（1）*羧肽酶Y的酶解反应* 将5 mg Ma Ⅰ和Ma Ⅱ分别溶解在2 ml pH 6.0，0.2 mol/l的磷酸缓冲液中，加入20 µl（10 n mol/µl）n-Lau作为内标。沸水浴中保温5分钟，冷却至25°C时，加入20 µl羧肽酶Y溶液（10 mg/ml），开始记录反应时间，25°C保温反应。1 min、5 min、20min、1 h、3 h分别取出100µl酶解液，立即与30µl20%的磺基水杨酸混合，终止反应。取50µl，在氨基酸组成分析仪上测定各种氨基酸的成分及含量。

（2）*羧肽酶A的酶解反应* 称取Ma Ⅰ和Ma Ⅱ各5.3 mg和5.7mg，分别加入2 ml 0.2 mol/l的甲基吗啉缓冲液（pH 8.1）溶解蛋白。加20 µl n-Leu（10 n mol/µl）作内标，沸水保温5 min，待冷却至25°C时加75 µl羧肽酶A溶液（约1 mg/ml）、25°C保温反应。按下列反应时间：1 min、2 min、5 min、10min、20min、1 h、2 h、4 h和6 h吸取100 µl酶解液，立即与30 µl 20%的磺基水杨酸混合，终止反应。取50 µl，测定各种氨基酸的成分和含量。

结 果 与 分 析

1.甜蛋白的羧甲基化

从图1的结果看，经还原和羧甲基化处理后的Ma Ⅱ纯化样品在Sephadex G25 柱被分离为二个组分，第一个组分是巯基被完全羧甲基化的 Ma Ⅱ。本文只取这一组分作进

一步分析。

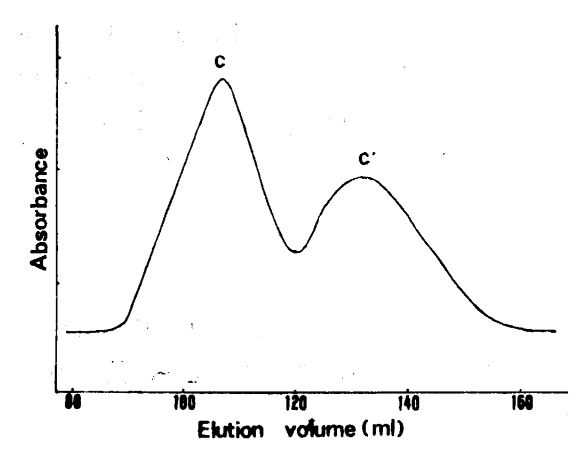


图 1　Ma Ⅱ经羧甲基化处理的反应液经 Sephadex G 25柱（23mm×55cm）的洗脱曲线。C：羧甲基化的Ma Ⅱ。

Fig. 1　Gel filtration of Ma Ⅱ after carboxymethylation treatment on Sephadex G-25 (23mm×55 cm). C: CM-Ma Ⅱ.

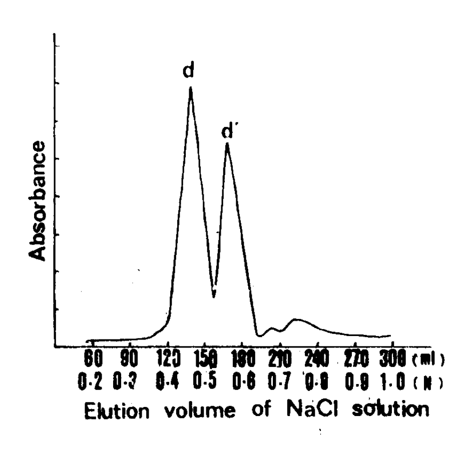


图 2　MaⅠ经羧甲基化处理的反应液在CM-纤维素柱（20mm×13cm）层析分离的洗脱曲线。d：羧甲基化的MaⅠ。

Fig. 2　Chromatogram of Ma Ⅰ after carboxymethylation treatment on CM-cellulose column (20mm×13cm). d: CM-Ma Ⅰ.

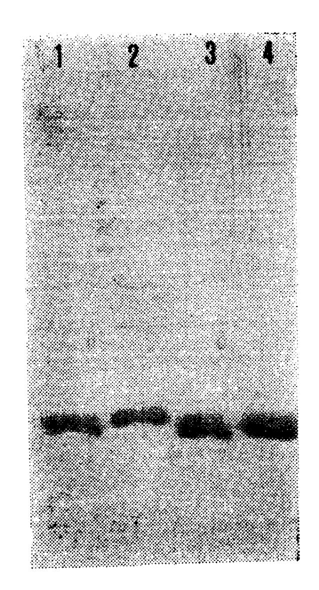


图 3　马槟榔甜蛋白和羧甲基化的马槟榔甜蛋白SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图。

1：Ma Ⅱ；　2：Ma Ⅰ；　3：羧甲基化的Ma Ⅱ；　4：羧甲基化的Ma Ⅰ。

Fig. 3　SDS-PAGE pattern of mabinlin and carboxymethylated mabinlin.

1: Ma Ⅱ.　2: Ma Ⅰ.　3: CM-Ma Ⅱ.　4: CM-Ma Ⅰ.

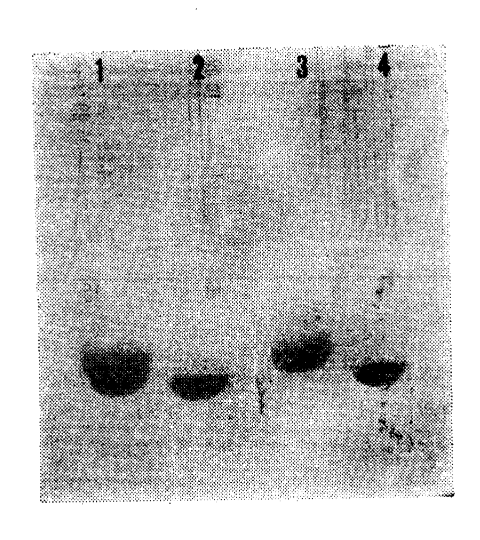


图 4　经盐酸－甲醇处理的马槟榔甜蛋白的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图。

1：Ma Ⅰ；　2：Ma Ⅱ　3：盐酸-甲醇处理的Ma Ⅰ；　4：盐酸—甲醇处理的Ma Ⅱ。

Fig. 4　SDS-PAGE pattern of mabinlin treated with 1 mol/l HCl-methanol. 1: Ma Ⅰ; 2: Ma Ⅱ; 3: Ma Ⅰ treated with 1 mol/l HCl-methanol; 4: Ma Ⅱ treated with 1 mol/l HCl-methanol.

经羧甲基化处理的MaI在CM-纤维素柱上也分为二个组分（图2）。巯基完全被羧甲基化的MaⅠ自柱上被洗脱的NaCl浓度为0.4 mol/l，第一组分就是该蛋白。第二组分则是在MaⅠ样品中的杂蛋白（MaⅢ）[2]，该杂质蛋白的巯基只有一个，而MaⅠ有5个巯基，羧甲基化处理后MaⅢ的等电点下降很少，须高达0.6 mol/l NaCl才能洗脱，因此，通过CM-纤维素柱可以将其与MaⅠ分开。这种方法同时达到了纯化MaⅠ的目的。经羧甲基化处理并分离出的MaⅠ和MaⅡ的SDS-PAGE图谱与原蛋白相同（图3），氨基酸组成分析中未见有半胱氨酸和胱氨酸，说明这种处理没有导至肽键裂解，巯基的羧甲基化也是完全的。

2．N-末端焦谷氨酸残基的开环

用盐酸-甲醇开环处理以后，MaⅠ和MaⅡ的SDS-PAGE图谱与原蛋白相同(图4)。未发现肽键断裂而产生的肽段，但是由于开环率不高等原因的影响，使得N-端的序列分析受到一定限制，只完成8个氨基酸残基的顺序测定。

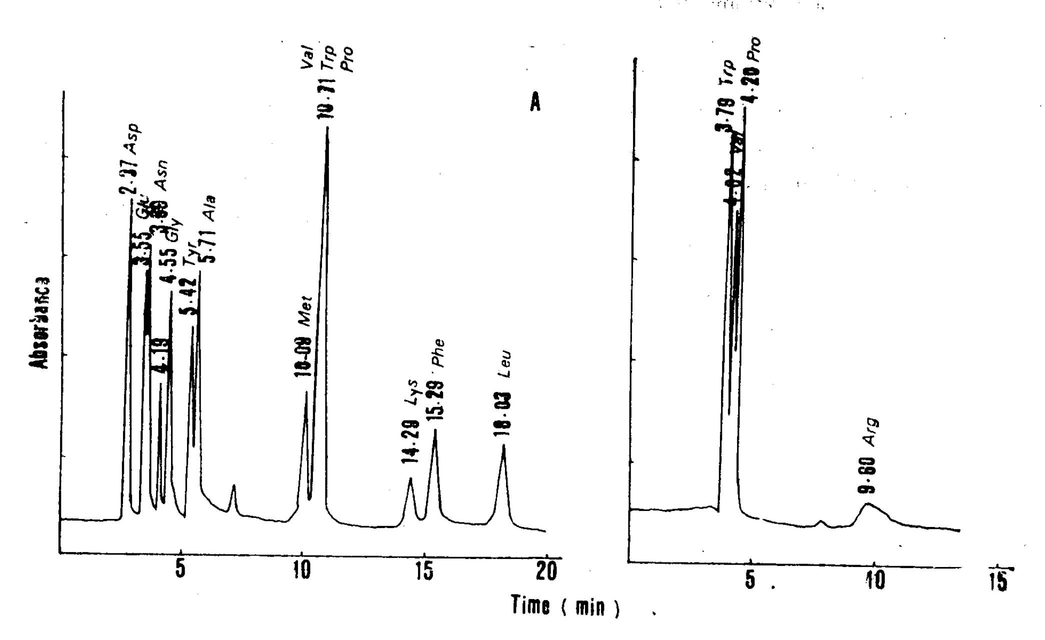


图5　标准PTH-氨基酸高压液相层析图谱。流动相：A．两步梯度洗脱，第一步，0.01 mol/l醋酸缓冲液pH 4.5/甲醇（1∶1 v/v）洗脱5分钟；第二步，0.01 mol/l醋酸缓冲液pH 6.0/甲醇（1∶1 v/v）洗脱15分钟。B．0.01 mol/l醋酸缓冲液pH6.0/甲醇（1∶4 v/v）洗脱15分钟。

Fig. 5　High performance liquid chromatograms of standard PTHs. Mabile phase: A. Two step-gradient elution: Step 1, 0.01 mol/l acetate buffer pH 4.5/methanol =1/1(v/v) for 5 min; step 2, 0.01 mol/l acetate buffer pH 6.0/methanol=1/1(v/v) for 15 min. B. 0.01 mol/l acetate buffer pH 6.0/methanol=1/4(v/v) for 15 min.

3．N-末端的测定和N端肽部分序列的分析

没有经过盐酸-甲醇溶液处理的MaⅠ和MaⅡ，用Edman降解法和DNS测N末端的方法都测不出任何氨基酸。加大样品量做Edman降解，N-末端测到Asn，可是PTH-Asn的量与甜蛋白样品量的克分子比小于0.05%，这只会是样品中含量极少的杂蛋白的N－

末端，而甜蛋白的N-末端没有被降解。经盐酸-甲醇溶液处理后，用Edman降解法测出二者的N末端均为Glu（图6、图7），证明Ma Ⅰ和Ma Ⅱ的N末端都是焦谷氨酸。然后，用手工Edman降解法测出了两种甜蛋白N端肽部分氨基酸的顺序，二者被测出的部分是相同的，都是Pyroglutamic acid-Pro-Arg-Gly-Pro-Ala-Leu-Arg-。每个被降解的PTH-aa的量和甜蛋白样品量的克分子比约10%，比PTH-Asn的回收率增加了200倍。但是10%的回收率也不高，主要原因是焦谷氨酸开环率和PTC-aa的萃取率（萃取6次，只用第一次萃取液做PTH-aa的转化）。

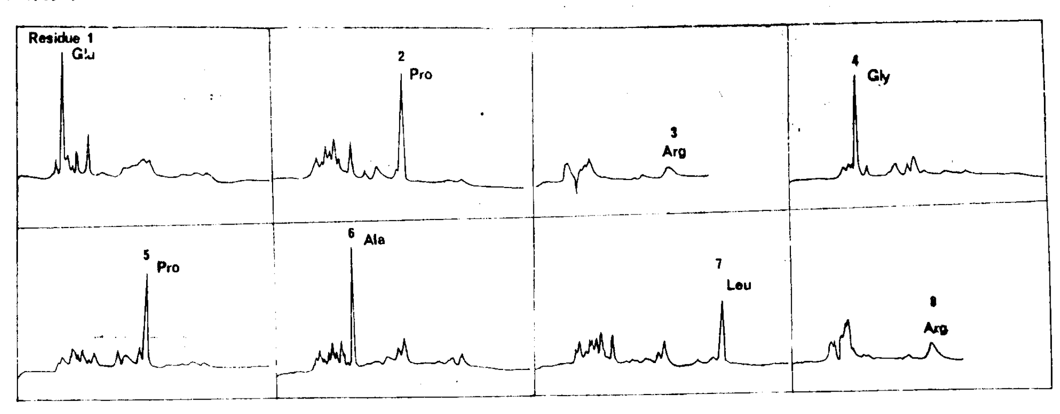


图6　用手工Edman降解Ma Ⅰ顺序的PTH-氨基酸的高压液相层析图谱。

Fig. 6　High performance liquid chromatograms of PTHs from the sequential degradation of Ma Ⅰ by manual Edman degradation.

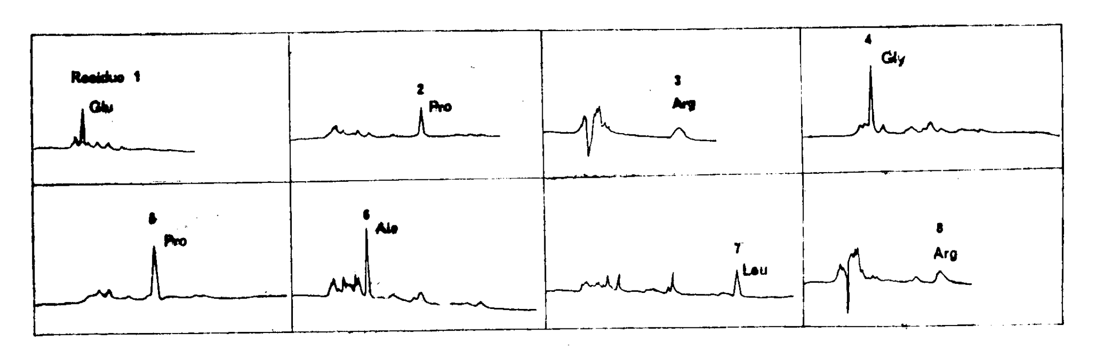


图7　用手工Edman降解Ma Ⅱ顺序的PTH-氨基酸的高压液相层析图谱。

Fig. 7　High performance liquid chromatograms of PTHs from the sequential degradation of Ma Ⅱ by manual Edman degradation.

4．C端肽部分氨基酸顺序的分析

在Ma Ⅰ和Ma Ⅱ羧端情况不知道时，首先用羧肽酶Y来酶解，这是因为羧肽酶Y对所有氨基酸都能酶解。使用它酶解可以大体上知道羧端肽有哪几种氨基酸。但由于羧肽酶Y酶解蛋白的速度太快，给排顺序带来困难，需要进一步做羧肽酶A或B的酶解。羧肽酶Y酶解Ma Ⅰ的结果是Ser、Ala和Phe释放较早，Ma Ⅱ是Ala和Phe释放早，都不是Arg和Lys释放早，因此用了羧肽酶A进一步酶解。根据不同时间取出的酶解液中氨基酸

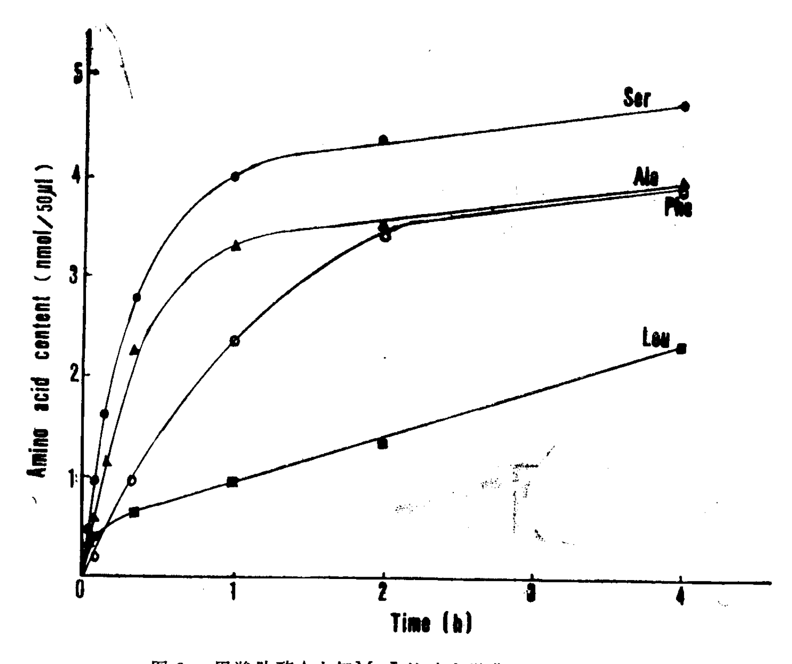


图8 用羧肽酶A水解MaⅠ的动力学曲线。

Fig. 8 Kinetic curves of the hydrolysis of MaⅠ by carboxypeptidase A.

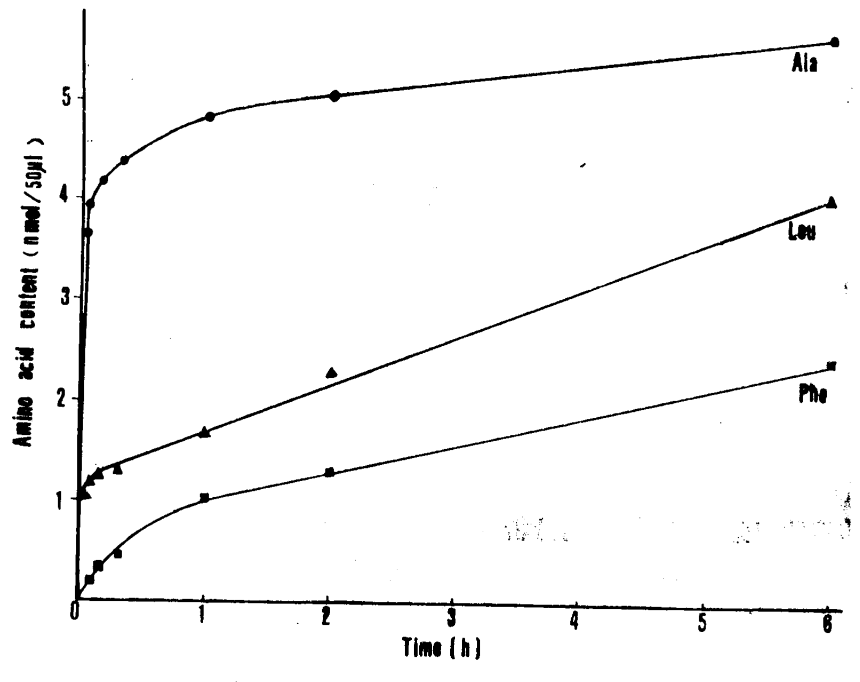


图9 用羧肽酶A水解MaⅡ的动力学曲线。

Fig. 9 Kinetic curves of the hydrolysis of MaⅡ by carboxypeptidase A.

的成分和含量，作出酶解动力学曲线(图 8 、图 9)。从图中看出Ma Ⅰ 释放氨基酸的顺序为Ser、Ala、Leu、Phe；Ma Ⅱ 为Ala、Leu、Phe。另外，从生理体液检测样品中知道Gln在Leu之后和 Phe 之前释放。这样就测得了甜蛋白羧端肽的氨基酸顺序，Ma Ⅰ 为-Phe-Gln-Leu-Ala-Ser；Ma Ⅱ 为-Phe-Gln-Leu-Ala。Ma Ⅰ 的羧末端比 Ma Ⅱ 多了一个Ser。单是末端Ser不足以解释Ma Ⅰ 和Ma Ⅱ 之间稳定性的差异，因此对二种蛋白的一级结构将作进一步分析。

致谢　C端肽的顺序分析得到上海有机化学研究所钱瑞卿老师的指导；PTH-氨基酸的高压液相分析得到黄清藻和王华的帮助。

参 考 文 献

1　胡忠，何敏．云南植物研究　1983；5（2）：207—212

2　胡忠，彭丽萍，何敏．云南植物研究　1985；7（1）：1—10

3　胡忠，梁汉兴，刘小烛．云南植物研究　1985；7（2）：187—194

4　丁鸣，胡忠．云南植物研究　1986；8（2）：181—192

5　Needleman S. B. Protein Sequence Determination. 2 nd ed. New York: Springer-Verlag Berlin. Heidelberg, 1975; 193—193, 232—258

N-AND C-TERMINAL PARTIAL AMINO ACID SEQUENCE DETERMINATION OF THE SWEET PROTEINS FROM THE SEED OF CAPPARIS MASAIKAI

Liu Xiaozhu Hu Zhong

(*Kunming Institute of Botany, Academemia Sinica, Kunming*)

Abstract Two sweet proteins named mabinlin Ⅰ and mabinlin Ⅱ (Ma Ⅰ, Ma Ⅱ) with MW. 11.6 kD and 10.4 kD respectively had been isolated. By using Edman degradation and the method of reversed phase HPLC identification of PTH-aa, it were found that the N-terminuses of both proteins are blocked because of cyclization of pyroglutamic acid. The pyrrolidone was opened by treatment with 1 mol/l HCl-methanol at 35°C for 24 h. The eight amino acid sequence of N-terminal peptide was pyroglutamic acid-Pro-Arg-Gly-Pro-Ala-Leu-Arg-in both proteins. Dynamic analysis of the enzymatic products by carboxypeptidase showed that the amino acid sequence of C-terminal peptide is -Phe-Gln-Leu-Ala-Ser in Ma Ⅰ, and -Phe Gln-Leu-Ala in Ma Ⅱ. the result means that even though the Ma Ⅱ lack a Ser residue at C-terminus the main difference of the two sweet proteins is not in the amino acid sequences of both C- and N- terminal regions.

Key words Sweet protein; *Capparis masaikai*; Amino acid sequence determination